

B7

**Title: CN1348011A: IN VITRO HUMAN B LYMPHOCYTE IMMUNIZING
PROCESS TO PRODUCE HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY**

Derwent Title: In vitro human B lymphocyte immunizing process to produce
human monoclonal antibody [[Derwent Record](#)]

Country: CN China

Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection

Inventor: YONGLI YU; China

Assignee: YU YONGLI China
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)



[High
Resolution](#)

Published / Filed: 2002-05-08 / 2000-10-08

Application CN20000000129579

Number:

IPC Code: Advanced: **C12P 21/08**;

Core: more...

IPC-7: **C12P 21/08**;

ECLA Code: None

Priority Number: 2000-10-08 **CN20000000129579**

Abstract: The present invention provides one method of producing B lymphocyte with specific antibody and humanized monoclonal antibody through in vitro immunizing human peripheral blood monocyte with antibody loaded human dendritic cell and then EB viral transformation. Using the said method can obtain human B lymphocyte cloning for producing humanized monoclonal antibody to said antigen and culturing the human B lymphocyte can produce humanized monoclonal antibody to various antigen and with clinical treatment and diagnosis value. The said method is suitable for producing monoclonal antibody in both lab and industry.

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12P 21/08

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00129579.9

[43]公开日 2002 年 5 月 8 日

[11]公开号 CN 1348011A

[22]申请日 2000.10.8 [21]申请号 00129579.9

[71]申请人 于永利

地址 100086 北京市海淀区海淀路 169 号兴发大厦 510 室北京迪威仁方生物技术有公司

[72]发明人 于永利

[74]专利代理机构 北京海虹嘉诚专利代理有限公司

代理人 张 涛

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 一种体外免疫人 B 淋巴细胞生产人单克隆抗体的方法

[57]摘要

本发明提供了一种用加载抗原的人树突状细胞体外免疫人外周血单核细胞,然后用 EB 病毒转化其中的生产特异性抗体的 B 淋巴细胞进而生产针对上述抗原的人源化单克隆抗体的方法。使用本发明所提供的方法可获得生产针对上述抗原的人源化单克隆抗体的人 B 淋巴细胞克隆,培养这些人 B 淋巴细胞就可生产针对各种抗原的、具有临床治疗和临床诊断价值的人源化单克隆抗体。本方法既适用于在实验室水平制备人单克隆抗体,也适用于人单克隆抗体的工业化生产。

ISSN 1008-4274

养产生单克隆抗体的 B 淋巴细胞，收集培养上清。

10、分离纯化单克隆抗体

培养上清中含有大量特异地针对上述抗原的人单克隆抗体，采用常规的生物化学技术分离纯化得到相应的人单克隆抗体。

本发明的有益效果：

本发明解决了不能通过使用抗原免疫人体而制备人单克隆抗体的难题，提供了可生产针对各种抗原的人源化单克隆抗体的方法。例如，利用本发明提供的方法可生产多种可用于治疗多种严重疾病如自身免疫性疾病和恶性肿瘤等的人源化单克隆抗体，从而为这些疾病的治疗奠定基础。此外，利用本发明提供的方法还可制备可用于人体细胞（如肿瘤细胞）定位的人源化单克隆抗体标记的放射性示踪物，从而为医学与生物学研究和临床诊断与治疗所应用。

下面叙述本发明的实施例：

一、抗人肿瘤坏死因子（TNF）的人源化单克隆抗体的生产。

生产方法如下：

1、分离培养人的树突状细胞

- 1) 用注射器抽取 10 毫升人外周血；
- 2) 用等体积 RPMI-1640 培养基(Biowhittaker, Walkersville, Maryland, USA) (含肝素 10 IU/毫升，不含胎牛血清) 稀释抽取的人外周血；
- 3) 稀释的人外周血于 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液上，二者的体积比是 2: 1。室温离心，1000g，15 分钟。吸取单核细胞层的细胞，收集自体血浆备用；
- 4) 以等体积的 RPMI-1640 培养基（含 5% 的胎牛血清）离心洗涤细胞（200 g，15 分钟）两次；
- 5) 将分离的外周血单个核细胞接种于 6 孔培养板（Falcon, Lincoln Park, NJ, USA），每孔含 8×10^6 个细胞，3 毫升含 1% 自体血浆，20 微克庆大霉素的 RPMI-1640 培养基。37°C，CO₂ 孵箱培养 2 小时。吸弃培养上清；
- 6) 加入 3 毫升含 1% 自体血浆，20 微克庆大霉素的 RPMI-1640 培养基。37°C，CO₂ 孵箱培养 2 小时。加入 100 IU/毫升粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和 800 U/毫升白细胞介素 4（IL-4），继续在 37°C，CO₂ 孵箱中培养 6 天；

用上述方法可分离到 $1.5-4 \times 10^5$ 个树突状细胞。

- 7) 鉴定树突状细胞细胞，其表型为：CD83 +, p55/fascin +, CD115/M-CSF-R-, CD86 +。

2、用肿瘤坏死因子加载树突状细胞

- 1) 在上述培养条件下，加经突变的肿瘤坏死因子(0.1 毫克)刺激分离的树突状细胞($1.5-4 \times 10^5$)；
 - 2) 继续培养树突状细胞 48 小时。
- ##### 3、分离人外周血单个核细胞
- 1) 用注射器抽取 10 毫升人外周血；
 - 2) 用等体积 RPMI-1640 培养基（含肝素 10 IU/毫升，不含胎牛血清）

稀释抽取的人外周血;

3) 加稀释的人外周血于 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液上, 二者的体积比是 2: 1。室温离心, 1000g, 15 分钟。吸取单核细胞层的细胞;

4) 以等体积的 RPMI-1640 培养基 (含 5% 的胎牛血清) 离心洗涤细胞 (200g, 15 分钟) 两次。

4、免疫人 B 淋巴细胞

将分离的外周血单个核细胞 (7.5×10^6) 和加载突变的肿瘤坏死因子的成熟树突状细胞 (1×10^5) 接种于 6 孔培养板 (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA), 于 3 毫升含 10% 胎牛血清, 20 微克庆大霉素/毫升的 RPMI-1640 培养基中, 37°C , CO_2 孵箱培养 2 天。

5、用 EB 病毒转化免疫的人 B 淋巴细胞

1) 滴加 0.5 毫升 EB 病毒上清, 加 5 微升 环孢霉素使其终浓度为 0.2 微克/毫升。采用 B95-8 marmoset 细胞扩增 EB 病毒, 液氮保存 (Hudson L, *Practical Immunology*, Blackwell Scientific Publications, 1989, Third Edition, 第 460-461 页);

2) 37°C , CO_2 孵箱培养 7 天, 移除 1 毫升旧培养液, 补充 10 毫升含 10% 胎牛血清, 20 微克/毫升庆大霉素/毫升的 RPMI-1640 (Biowhittaker, Walkersville, Maryland, USA) 培养基, 37°C , CO_2 孵箱培养 3-4 周;

2) 在倒置显微镜下观察, 将表现生长的细胞移入含 10 毫升 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 的 25cm^2 细胞培养瓶中, 继续于 37°C , CO_2 孵箱培养;

3) 观察细胞可见其成簇或以单细胞悬液的形式生长, 1 周后或根据具体情况进行传代。

6、转化细胞的克隆化培养

1) 采用在含 15% 胎牛血清、20 微克庆大霉素/毫升的 RPMI-1640 (Biowhittaker, Walkersville, Maryland, USA) 培养基中系列稀释的转化 B 淋巴细胞, 调其浓度为 8-10 个细胞/毫升。取 100 微升接种 96 孔培养板。 37°C , CO_2 孵箱培养 7-10 天。从第二天开始每天观察细胞, 并对只有一个细胞克隆生长的孔做标记;

2) 取含单克隆细胞转化 B 淋巴细胞的孔的培养上清, 用 ELISA 方法检测其中存在的抗体。

7、采用 ELISA 方法筛选产生特异性单克隆抗体的转化细胞克隆

1)、将人肿瘤坏死因子 (1-6 微克/毫升) 溶于 Bicarbonate 包被液 (1.59 克 Na_2CO_3 , 2.93 克 NaHCO_3 , 0.2 克 NaN_3 , 用双蒸水补齐至 1 升, pH 9.6), 加 100 微升于 96 孔培养板的孔中, 室温 ($20-25^\circ\text{C}$) 过夜, 4°C 继续放置 4-12 小时;

2) 吸弃包被液, 用 PBS/Tween (含 0.05 % Tween 20 的 PBS) 洗三次。每孔加 100 微升 PBS/BSA/Tween 封闭液 (含 0.05 % Tween 20, 1% BSA 的 PBS), 室温 ($20-25^\circ\text{C}$) 放置 80 分钟;

3) 用 PBS/Tween (含 0.05 % Tween 20 的 PBS) 洗涤三次;

4) 每孔加 75 微升待检上清 (取自含单克隆细胞的培养孔), 设两个复孔, 室温 ($20-25^\circ\text{C}$) 放置 2 小时;

5) 吸弃孔中液体, 用 PBS/Tween (含 0.05 % Tween 20 的 PBS) 洗三次;

6) 加 75 微升辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体, 室温孵育 2 小时;
7) 用 PBS/Tween (含 0.05 % Tween 20 的 PBS) 洗涤三次, 双蒸水洗涤一次;

8) 加 100 微升邻-苯二胺 (OPD) (溶于磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液, pH 5.0) 底物显色液, 室温静置 15-60 分钟, 待明显的颜色出现; 加 40 微升 3M NaOH 终止反应;

9) 采用酶标仪在 492 纳米波长测定 OD 值。

8、扩增、保存产生人肿瘤坏死因子特异性单克隆抗体的 B 淋巴细胞

1) 采用含 10% 胎牛血清、20 微克庆大霉素/毫升的 RPMI-1640 (Biowhittaker, Walkersville, Maryland, USA) 培养基, 37°C, CO₂ 孵箱扩增培养转化的产生人肿瘤坏死因子特异性单克隆抗体的 B 淋巴细胞;

2) 在液氮中保存产生人肿瘤坏死因子特异性单克隆抗体的 B 淋巴细胞。

9、培养产生人单克隆抗体的 B 淋巴细胞

采用含 10% 胎牛血清和 20 微克庆大霉素/毫升的 RPMI-1640 (Biowhittaker, Walkersville, Maryland, USA) 培养基, 37°C, CO₂ 孵箱扩增培养产生特异性抗人肿瘤坏死因子的人单克隆抗体的 B 淋巴细胞, 收集培养上清。

10、分离纯化单克隆抗体

培养上清中含有大量特异性抗人肿瘤坏死因子的人单克隆抗体, 采用常规的生物化学技术分离纯化人肿瘤坏死因子的人单克隆抗体。

此种单克隆抗体可表现出很好的治疗类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、Crohn's 病 (Crohn's disease) 和感染性休克等疾病的效果。文献中已有关于抗人肿瘤坏死因子的单克隆抗体的疗效的报道 (Raza A, *Microsc. Res. Tech.*, 2000 Aug 1, 50(3):229-35; Brandt J 等, *Arthritis Rheum.*, 2000 Jun., 43(6):1346-52; Vincent JL, *J. Clin. Pract.* 2000 Apr., 54(3):190-3; Kavanaugh A 等, *J. Rheumatol.*, 2000 Apr, 27(4):841-50; Maini RN 和 Taylor PC., *Annu. Rev. Med.*, 2000, 51:207-29), 但却没有解决单克隆抗体的人源化问题。本发明所提供的方法解决了此问题。

二、抗 HER2 抗原人源化单克隆抗体的生产。

生产方法如下:

重复实施例一的步骤 1 到步骤 10, 不同的只是在步骤 2 中用经突变的 HER2 特异性抗原 (0.1 毫克) 刺激分离得到的树突状细胞。最后得到的是特异性抗 HER2 抗原的人单克隆抗体。

HER2 抗原是由 HER2 原癌基因编码的 185 kDa 的跨膜受体糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性转化细胞活性。HER2 抗原在 10-40% 的人乳腺肿瘤细胞有过度表达, 因此成为乳腺癌免疫治疗的靶点。动物实验表明, 采用人源 HER2 特异性的单克隆抗体制成的免疫毒素对乳腺癌的治疗有明显的治疗作用。文献中已有关于 HER2 特异性单克隆抗体对于乳腺癌疗效的报道 (Rosenblum M.G 等, *Int. J. Cancer*, 2000 Oct 15, 88(2):267-273; Dillman RO., *Cancer Biother. Radiopharm.*, 1999 Feb., 14(1):5-10; Dakappagari N.K 等, *Cancer Res.*, 2000 Jul. 15, 60(14):3782; Klapper L.N 等, *Cancer Res.*, 2000 Jul. 1, 60(13):3384-8), 但却没有解决单克隆抗体的人源化问题。本发明所提供的方法解决了此问题。